

BEST AVAILABLE COPY

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/001792

International filing date: 13 June 2005 (13.06.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0043312
Filing date: 12 June 2004 (12.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

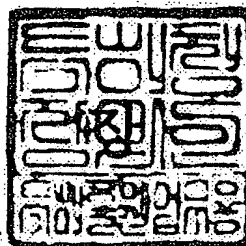
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0043312 호
Application Number 10-2004-0043312

출 원 일 자 : 2004년 06월 12일
Date of Application JUN 12, 2004

출 원 인 : 주식회사 디지털바이오테크놀로지
Applicant(s) Digital Bio Technology Co., Ltd.

2005 년 06 월 17 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2004.06.12
【발명의 국문명칭】 전기천공용 미세채널 장치 및 이를 포함하는 전기천공 장치
【발명의 영문명칭】 An Apparatus provided with Microchannel for
Electroporation and an Electroporator Comprising the Same

【출원인】

【명칭】 주식회사 디지털바이오테크놀로지

【출원인코드】 1-2000-049798-4

【대리인】

【성명】 김영철

【대리인코드】 9-1998-000040-3

【포괄위임등록번호】 2003-030658-4

【대리인】

【성명】 김순영

【대리인코드】 9-1998-000131-1

【포괄위임등록번호】 2003-030659-1

【발명자】

【성명의 국문표기】 장준근

【성명의 영문표기】 CHANG, Jun Keun

【주민등록번호】 670916-1047621

【우편번호】 137-064

【주소】 서울특별시 서초구 방배4동 그랑시엘 빌라 501호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조근창

【성명의 영문표기】 CH0,Keunchang
【주민등록번호】 680715-1075619
【우편번호】 151-055
【주소】 서울특별시 관악구 봉천5동 관악드림타운 APT 109동 501호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 신영식
【성명의 영문표기】 SHIN,Young Shik

【주민등록번호】 780115-1009413
【우편번호】 120-013
【주소】 서울특별시 서대문구 충정로3가 33-10
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 정찬일
【성명의 영문표기】 CHUNG,Chanil
【주민등록번호】 691224-1066914
【우편번호】 437-080
【주소】 경기도 의왕시 내손동 삼성래미안 106동 2201호
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 김영철 (인) 대리인
 김순영 (인)

【수수료】

【기본출원료】 0 면 38,000 원
【가산출원료】 44 면 0 원

| | | |
|------------------|---------------------|--------------|
| 【우선권주장료】 | 0 건 | 0 원 |
| 【심사청구료】 | 23 항 | 845,000 원 |
| 【합계】 | 883,000 원 | |
| 【감면사유】 | 소기업(70%감면) | |
| 【감면후 수수료】 | 264,900 원 | |
| 【첨부서류】 | 1. 소기업임을 증명하는 서류_1통 | |

【요약서】

【요약】

본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공용 미세채널 장치로서, 상기 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍 또는 그 이상의 웰이 양측에 형성되어 있고; 상기 웰 중 서로 대응하는 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 하나 이상 형성되어 있는 미세채널 장치에 관한 것이다.

본 발명에 있어서, 상기 채널의 채널경로길이는 서로 상이하게 조절하여 제조할 수 있기 때문에, 채널마다 상이한 전기장을 인가할 수 있다. 또한, 채널을 유리 또는 석영으로 제조하여 수회 사용할 수 있으며, 플라스틱으로 제조하는 경우에는 저렴한 비용으로 용이하게 제조할 수 있고, 1회용으로 간편하게 사용할 수 있다. 또한, 전기천공에 의하여 세포 내에 물질이 유입되는 과정을 시각적으로 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 미세채널 장치는 펄스를 인가하는 전극과 분리되어 있기 때문에, 상기 미세채널 장치만을 교체할 수 있고, 고가의 전극은 영구적으로 사용할 수 있다.

【대표도】

도 3a

【명세서】

【발명의 명칭】

전기천공용 미세채널 장치 및 이를 포함하는 전기천공 장치 {An Apparatus provided with Microchannel for Elctroporation and an Elctroporator Comprising the Same}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 종래의 전기천공 장치에 사용되는, 평행판 알루미늄 전극이 구비된 2mm 간극의 큐벳을 도시한 것이다.
- <2> 도 2는 종래의 전기천공 장치인 스퀘어 웨이브 전기천공 장치(ECM 830, BTX, 미국)를 도시한 것이다.
- <3> 도 3a 및 도 3b는 본 발명에 따른 미세채널 장치의 예를 도시한 것이다.
- <4> 도 4a는 본 발명에 따른 미세채널 장치의 사시도이다.
- <5> 도 4b는 본 발명에 따른 미세채널 장치의 단면도이다.
- <6> 도 5a 내지 도 5d는 채널경로길이가 서로 상이한 미세채널 장치의 예를 도시한 것이다.
- <7> 도 6은 채널 폭이 서로 상이한 미세채널 장치의 예를 도시한 것이다.
- <8> 도 7a 및 도 7b는 채널경로길이와 채널폭이 모두 상이한 미세채널 장치의 예를 도시한 것이다.
- <9> 도 8a는 본 발명에 따른 전기천공용 미세채널 장치의 예를 촬영한 사진이다.

- 10> 도 8b는 현미경 위에 놓여진, 본 발명에 따른 전기천공용 미세채널 장치 및 전극 홀더를 도시한 것이다.
- 11> 도 9는 종래의 A1 전극이 구비되어 있는 큐벳을 사용하여 전기천공하는 경우, 전기 펄스 인가 직전(a) 및 직후(b)의 A1 전극 표면을 도시한 것이다.
- 12> 도 10은 $100\mu\text{m}$ 폭 미세채널 내에서 염료의 일종인 요오드화 프로피듐(PI, propidium iodide)의 유입 과정을 도시한 것이다.
- 13> 도 11은 $100\mu\text{m}$ (a) 및 $500\mu\text{m}$ (b)의 상이한 채널 폭을 갖는 두 개의 미세채널에서 전기천공을 통하여 PI를 주입한 세포의 현미경 사진이다.
- 14> 도 12는 채널 폭에 따른 PI의 발광 세기를 비교한 그래프이다.
- 15> 도 13은 $150\mu\text{m}$ (a) 및 $500\mu\text{m}$ (b)의 상이한 채널 폭을 갖는 두 개의 미세채널에서 전기천공 전후의 세포 크기 변화를 도시한 것이다.
- 16> 도 14는 미세채널에서 7일간 세포를 배양한 결과를 도시한 것이다.
- 17> 도 15a는 0.75kV/cm 의 전기장을 10ms 동안 인가한 후 24시간이 경과한 때의 세포를 명시야(bright field)로 관찰한 사진이다.
- 18> 도 15b는 0.4kV/cm 의 전기장을 10ms 동안 인가한 후 24시간이 경과한 때의 세포를 명시야와 형광으로 겹쳐서 관찰한 사진이다.
- 19> 도 15c는 상기 도 15b의 세포를 형광으로 관찰한 사진이다.
- 20> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>
- 21> 101~105, 111~115 : 홀 201~205 : 미세채널

22> 300 : 상부기관 400 : 하부기관

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

23> 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공용 미세채널 장치로서, 상기 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍 또는 그 이상의 웰이 양측에 형성되어 있고; 상기 웰 중 서로 대응하는 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 하나 이상 형성되어 있는 미세채널 장치에 관한 것이다.

24> 전기천공법(electroporation)이란, 세포막을 투과하지 못하는 거대분자(macromolecule)를 전기 펄스에 의하여 세포 내로 주입하는 기술이다. 상기 전기천공법은 유전자 치료에 직접적으로 적용될 수 있는, 매우 강력하고, 널리 사용되는 방법이다. 높은 전기장이 인가되는 경우, 세포막이 일시적으로 다공성화되고, 외부 물질에 대하여 투과성을 나타낸다. 이러한 전기적 투과성화(electropermeabilization)는 여러 가지 요인(예를 들어, 펄스 폭, 펄스 지속시간, 펄스 수, 및 다른 실험 조건 등)에 의존한다.

25> 여러 연구자들이 전기천공의 기전을 이해하고, 전달감염(transfection)의 효

과를 증진시키기 위하여, 상기 파라미터들에 대한 다양한 이론적·실험적 연구를 수행하였다. 전기장의 세기가 막을 투과성화시키고, 전달이 일어나는 세포 면적의 범위를 제어하는 결정적 파라미터인 것으로 보고되었다. 그밖에, 다른 파라미터에 대한 연구도 진행되었다. 그러나, 전기 펄스에 대한 세포의 응답 및 DNA 전달 기전에 대해서는 거의 알려진 것이 없다. 전기천공의 기전에 대한 빈약한 이론으로 인하여, 전기천공의 시각화가 중요한 문제로 대두되었다.

26> 세포 현탁액 및 유전자의 혼합물에 전기장을 인가하기 위하여, 도 1에 도시되어 있는 바와 같이 두 개의 평행한 전극판이 구비된 큐벳이 통상적으로 사용된다. 상기 두 개의 전극판 사이에 높은 전기장을 인가하는 경우, 유전자를 세포 내로 주입할 수 있다. 상기 일회용 큐벳의 전극으로는 알루미늄 전극이 사용된다. 그러나, 상기 알루미늄 전극으로부터 방출되는 Al^{3+} 이온이, 세포에 악영향을 끼치는 것으로 보고되었다. 또한, 알루미늄 전극을 사용하는 경우, 전극 상의 산화물층 사이의 전압 강하로 인하여 전기장의 세기가 달라질 수 있다. 따라서, 백금 또는 금 전극을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 이러한 재질의 전극은 고가이기 때문에, 1회 또는 수회 사용 후 버려지는 큐벳의 전극으로 사용하기에는 현실적으로 어려움이 있다.

27> 도 2는 종래 전기천공 장치의 예로서, 스퀘어 웨이브 전기천공 장치(ECM 830, BTX, 미국)를 도시한 것이다. 이러한 종래의 전기천공 장치는 다음과 같은 문제점이 있다.

28> 첫째, 큐벳이 지나치게 고가이다. 이는 큐벳 내 마주보는 두 면에 전극이 장착되어 있기 때문이다. 따라서, 전기천공 장치 제조사들은 큐벳을 일회용으로 사용할 것을 권장하지만, 많은 사용자들은 수회 반복하여 실험하기 때문에, 실험 오차가 발생할 가능성이 높다.

29> 둘째, 전극 물질(Al)이 용액 내에서 반응성이 우수하고, 수소 생성에 대한 과전압(overpotential)이 낮기 때문에, 전기 펄스에 대하여 반응하거나, 전극 표면에서 물분해에 의한 기포가 발생된다.

30> 셋째, 생성된 이온(Al^{3+})은 세포에 악영향을 미친다.

31> 넷째, 산화막(Al_2O_3)으로 인하여 표면 저항이 크게 증가한다.

32> 다섯째, 전기장이 균일하지 않다. 대부분의 전류가 전극의 모서리 부분을 통하여 흐르기 때문에 전기장이 왜곡된다.

33> 여섯째, 시료의 부피가 크다. 따라서, 단일 세포 분석에 적합하지 않다.

34> 따라서, 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 새로운 전기천공 장치의 개발이 필요하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

35> 본 발명은 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 세포를 포함하는 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍 또는 그 이상의 웰이 양측에 형성되어 있고; 상기 웰 중 서로 대응하는 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 하나 이상

형성되어 있는 전기천공용 미세채널 장치 및 이를 포함하는 전기천공 장치에 관한 것이다.

- 36> 따라서, 본 발명의 목적은 전기천공용 미세채널 장치를 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 상기 미세채널 장치를 포함하는 전기천공 장치를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- 37> 본 발명은 세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공용 미세채널 장치로서, 상기 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍 또는 그 이상의 웰이 양측에 형성되어 있고; 상기 웰 중 서로 대응하는 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 하나 이상 형성되어 있는 미세채널 장치에 관한 것이다.

- 38> 또한, 본 발명은 상기 미세채널 장치 및 소정 시간 간격의 전기 펄스를 발생시키는 펄스 생성기를 포함하되, 상기 펄스 생성기에는 시료에 상기 전기 펄스를 인가할 수 있는 전극이 구비되어 있는 전기천공 장치에 관한 것이다.

- 39> 본 발명에 따른 전기천공 장치에 있어서, 상기 전극으로는 백금전극 또는 금전극을 사용하는 것이 바람직하다.

- 40> 이하에서는 도면을 참조하여 본 발명에 따른 전기천공용 미세채널 장치의 실

시예를 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 발명이 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

41> 도 3a 및 도 3b는 본 발명에 따른 미세채널 장치의 일예를 도시한 것이다. 도 4a는 상기 도 3a에 도시되어 있는 미세채널 장치의 사시도이고, 도 4b는 상기 미세채널 장치의 A-A 라인을 절취한 단면도이다.

42> 상기 미세채널 장치는 세포를 포함하는 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍 이상의 웰(101~105, 111~115)이 양측에 형성되어 있고; 상기 웰 중 서로 대응하는 웰(101-111, 102-112, 103-113, 104-114, 105-115)을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널(201-205)이 형성되어 있다. 상기 웰에 전극을 삽입한 후, 전기 펄스를 인가함으로써, 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입할 수 있다.

43> 상기 미세채널 장치에서, 채널(201, 205), 채널(202, 204), 및 채널(205)의 채널경로길이는 서로 상이하다. 따라서, 펄스 생성기의 전극에 동일한 전압을 인가하여도, 각 채널에서의 전기장의 세기는 상이하게 된다.

44> 상기 전기장의 세기는 하기 수학식 1에 의하여 구할 수 있다

【수학식 1】

45> $E = V / L$

46> 상기식에서,

47> E는 인가되는 전기장의 세기이고,

- 48> V는 전극 양단의 전압차이며,
- 49> L은 채널경로의 길이이다.
- 50> 따라서, 상기 미세채널 양단에 동일한 전압 V를 인가하더라도, 채널경로 길이 L이 달라짐에 따라, 서로 다른 세기의 전기장을 얻을 수 있다.
- 51> 본 발명에 따른 미세채널 장치는 일체형으로 제조하거나, 유리 기판 또는 플라스틱 기판을 접합하여 제조할 수 있다.
- 52> 플라스틱 기판으로 접합하여 제조하는 경우, 본 발명에 따른 미세채널 장치는 상부기판 및 하부기판을 포함하되, 상부기판에는 상기 웰을 형성하는 홀이 형성되어 있고, 상부기판 또는 하부기판에는 상기 미세채널이 음각되어 있는 것이 바람직하다.
- 53> 상기 상부기판 및 하부기판으로는 임의의 투광성 플라스틱 또는 유리를 사용한다. 예를 들어, 폴리디메틸실록산(PDMS, polydimethylsiloxane), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA, polymethylmethacrylate), 폴리카보네이트(PC, polycarbonate), 사이클릭올레핀코폴리머(COC, cyclic olefin copolymer), 폴리스티렌(PS, polystyrene), 폴리에틸렌(PE, polyethylene), 사이클로올레핀폴리머(COP, cyclo-olefin polymer), 폴리이미드(polyimide), 실리콘(silicon), 유리(glass), 또는 석영(quartz) 등의 재질을 사용할 수 있다.
- 54> 상기 예시한 플라스틱 재질들은 본 발명에 따른 미세채널 장치의 소재로서 우수한 장점을 갖는다. 상기 재질들을 이용하여 본 발명에 따른 미세채널 장치를

제조하는 것이 용이하다. 또한, 상기 재질들은 저렴하고, 투명하며, 생체적합하다. 투명한 플라스틱 소재를 사용하는 경우, 세포 내로 물질이 흡수되는 과정을 실시간으로 그 자리에서 관찰할 수 있다. 따라서, 생존 세포 내로 유전자를 전달하는 과정을 시각적으로 보여줄 수 있다.

55> 또한, 이러한 소재의 미세채널 장치는 PCR(중합효소연쇄반응), CE(모세관 전기영동법), 혼합 또는 여과 등을 수행하는 다른 시스템에도 용이하게 적용될 수 있다.

56> 본 발명에 따른 미세채널 장치에 있어서, 미세채널의 길이는 1mm 내지 10cm로 제조하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 미세채널의 길이가 약 1cm 내지 5cm가 되도록 제조한다. 미세채널의 높이는 약 $2\mu\text{m}$ 내지 2mm로 제조하고, 폭은 약 $10\mu\text{m}$ 내지 10mm로 제조하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 미세채널의 높이가 약 $20\mu\text{m}$ 내지 $100\mu\text{m}$ 이고, 폭이 약 $100\mu\text{m}$ 내지 1mm가 되도록 제조한다. 본 발명에 따른 미세채널 장치는 MEMS 기술에 의하여 제조할 수 있다.

57> 도 5a 내지 도 5c에 도시되어 있는 미세채널 장치에서는 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 복수개의 쌍의 웰이 양측에 형성되어 있고; 상기 복수개의 쌍의 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 각 쌍의 웰에 대하여 1개씩 형성되어 있다.

58> 특히, 도 5c에 도시되어 있는 미세채널 장치에서는, 각 쌍의 웰 사이의 최단

거리가 서로 상이하도록 웰이 배치되어 있다.

59> 도 5d에 도시되어 있는 미세채널 장치에서는 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍의 웰이 양측에 형성되어 있고; 상기 1쌍의 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 복수개 형성되어 있다.

50> 도 6에 도시되어 있는 미세채널 장치에서는 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 복수개의 쌍의 웰이 양측에 형성되어 있고, 각각의 쌍의 웰에 대해서는 채널이 1개씩 형성되어 있으며, 각각의 채널의 폭은 서로 상이하다.

51> 전술한 미세채널 장치의 실시예와 같이, 각 채널의 채널경로길이가 서로 상이한 경우 각 채널마다 상이한 전기장을 인가할 수 있다.

52> 도 7a 및 도 7b에 도시되어 있는 미세채널 장치에서는 대응하는 웰을 연결하는 각 채널의 채널경로길이 및 채널 폭이 모두 상이한 경우이다.

53> 본 발명에 따른 미세채널 장치에서는 미세채널을 통해서만 전류가 흐르기 때문에, 종래의 전기천공 장치와 비교할 때 동일한 전기장에서 훨씬 적은 전류가 흐른다. 따라서, 전력 소모를 최소화할 수 있고, 필요한 경우 건전지를 전원으로 사용하는 휴대용 장치로도 제조할 수 있다.

54> 세포가 열에 의하여 손상되는 것은 주지의 사실이고, 전기천공 자체가 세포에 스트레스를 주기 때문에, 열에 의한 스트레스도 중요한 고려 사항이다. 본 발명에 따른 미세채널 장치는 부피에 대한 표면적 비가 크기 때문에, 전압 펄스로 인

한 열을 신속하게 제거할 수 있다.

55> 또한, 미세채널을 통하여 흐르는 전류를 측정함으로써, 세포의 전기천공 상태에 관한 정보를 전기적으로 측정할 수 있다.

56> 본 발명에 따른 미세채널 장치는 DNA 전달의 제1단계인 전기천공에 유용하게 사용될 수 있으며, 전기천공 기전에 관한 연구에 기여할 수 있다. 또한, 유전자 조작시 전기천공 장치를 소형화할 수 있다.

57> 이하에서는 도면을 참조하여, 본 발명에 따른 미세채널 장치를 이용한 전기천공 실험에 대하여 설명한다.

58> 본 발명에 따른 효과를 확인하기 위하여, SK-OV-3 세포 내로 요오드화 프로피듐(PI, propidium iodide)을 주입하는 실험을 수행하였다. 또한, 다양한 폭의 미세채널에 대하여 전기천공을 실험한 결과, 상기 미세채널의 기하학적 요인이 전기천공에 영향을 미친다는 것을 밝혀냈다. 이는, 기하학적 형상이 전기천공시 고려하여야 할 또하나의 파라미터가 될 수 있음을 의미한다.

59> 본 발명에 따른 미세채널 장치 내에서 세포 배양이 가능하다. 또한, 형광발현 유전자를 SK-OV-3 세포 내에 주입하고, EGFP(enhanced green fluorescent protein)를 성공적으로 발현시킴으로써, 유전자 조작 시 본 발명에 따른 미세채널 장치가 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

70> 1. 미세채널 장치의 제조

71> 전극을 삽입하기 위한 웰과, 상기 웰을 연결하는 미세채널을 구비하는 미세 채널 장치를 몰딩 등의 방법에 의하여 제조하였다.

72> 또한, 포토 마스크를 사용하는 포토리소그래피 방법에 의하여 미세채널의 패턴을 형성시킬 수 있다.

73> 예를 들어, 먼저 네거티브 포토리지스트(SU-8, MicroChem, 매사추세츠, 미국)를 실리콘 웨이퍼 상에 스핀코팅하여, $20\mu\text{m}$ 두께의 몰드 마스터를 형성한다. 이후, 소프트 베이크를 수행하고, 마스크 패턴을 마스크 얼라이너(MA-6, Karl Suss GmbH, 독일)에 의하여 상기 SU-8 코팅된 실리콘 웨이퍼 상으로 옮긴다. SU-8 패턴을 노광시킨 후, 노광 후 베이크(post-exposure bake), 현상 및 하드 베이크 공정을 수행한 후, PDMS 및 큐어 에이전트의 혼합물(Sylgard 184, DOW Corning Co., 미국)을 상기 패턴 상에 붓는다. 큐어 조건은 90°C 에서 30분간이다. PDMS를 유리 기판과 접합시키고, 25W 산소 플라즈마 처리하여 미세채널을 형성시킨다.

74> 상기 미세채널의 높이는 $20\mu\text{m}$ 이고, 길이는 2cm이다. 채널의 폭을 100 내지 $500\mu\text{m}$ 로 다양하게 제조하였다. 도 8a는 상기 제조된 미세채널 장치를 촬영한 사진이다.

75> 2. 세포의 준비 및 배양

76> 10%(v/v)의 열-불활성 소태아혈청(FBS, Sigma), 페니실린(100유닛/ml), 스트

렙토마이신($100\mu\text{g/ml}$) 및 L-글루타민(4mM)이 공급된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하는 37°C , 습윤 $5\% \text{CO}_2$ 인큐베이터에서 SK-OV-3 세포를 성장시켰다. 트립신-EDTA를 사용하여 25cm^2 의 조직 배양 플라스크에서 세포를 분리하였다. 최종 세포 현탁액 농도를 1×10^7 세포/ml로 조정하였다. 펄스 인가 후 세포의 성장 능력을 생존능의 직접적 증거로서 사용하였다.

77> 전기 펄스를 가하기 전에, PI를 세포 배지에 가하였다. PI는 통상적으로 사용되는 형광 마커이다. 상기 PI는 생존 세포 내 세포막 주입의 지시자이며, 핵산 분자 사이에 삽입된다. 세포막이 투과성인 경우, PI는 세포내로 들어가서, 핵산과 결합하여, 적색 형광을 방사한다. 적색 형광의 세기가 핵산에 결합된 PI의 양에 따라 결정되므로, 정량 분석이 가능하다. 본 실험에서는 PI 1.0mg/ml 를 1:20(v/v)의 비율로서 세포 배지에 가하였다.

78> 해파리(*Aequorea victoria*)로부터 추출된 녹색 형광 단백질(GFP, green fluorescent protein)이, 높은 가시성 및 효과적인 내부 형광발색단(fluorophore)의 방사로 인하여, 생화학 및 세포생물학 분야에서 다양하게 사용된다. 상기 GFP는 세포 및 기관 내에서 유전자 발현 및 단백질 표적화의 마커로서 사용된다. 본 실험에서는 대장균 *E. coli* 유래의 GFP를 전달하는 pEGFP-N1 플라스미드를 추출·정제하기 위하여, 플라스미드 아이솔레이션 키트(Promega, 미국)를 사용하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 아가로스 겔 상에서 전기영동으로 확인하였다. 분광광도계를 사용하여 260nm 에서의 흡광도를 측정하여 농도를 측정하였다. 펄스를 인가하

기 전에, $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 펄스 배지에 플라스미드 pEGFP-N1을 가하였다. 리포터 유전자의 발현을 성공적인 감염의 평가로서 사용하였다.

79> EGFP의 발현을 검사하기 위하여, 전기 펄스에 노출된 세포를 배양하였다. 펄스 인가 후에, 미세채널 장치를 DMEM 배지에 침지시킨 후, 감염 전에 24시간 인큐베이터에 놓았다. 세포를 배양하기 위해서, 상기 미세채널 장치에 O_2 플라스마 이외의 전처리를 수행하지는 않았다.

30> 3. 전기천공 실험 과정

31> 전기천공을 위한 실험 장치는 가정용 전원, Pt 전극, 및 전극 홀더 등으로 구성된다. 전극 홀더를 현미경 상에 장착시킴으로써, 전기 펄스 인가 중의 전기투과성화 과정을 관찰할 수 있다. 아날로그 출력 보드(COMI-CP301, Comizoa, 한국)를 통하여 전기천공 장치를 컴퓨터에 연결하고, LabVIEW ver 6.1(National Instrument, 미국) 프로그램으로 제어하였다.

32> 본 발명에 따른 미세채널 장치의 성능을 확인하기 위하여, 스퀘어 웨이브 전기천공 장치(ECM 830, BTX, 미국, 도 2 참조) 및 평행판 알루미늄 전극이 구비된 2mm 간극의 큐벳(도 1 참조)에서의 결과와 비교하였다. 동일한 전기장($1\text{kV}/\text{cm}$)에서 두 시스템의 성능을 분석하기 위하여, 큐벳에 200V를 인가하고, 본 발명에 따른 미세채널 장치에 2kV를 인가하였다. 채널 폭을 $100\mu\text{m}$ 내지 $500\mu\text{m}$ 범위에서 $100\mu\text{m}$ 단위로 변화시켜, 5가지 경우에 대하여 PI를 사용하여 실험을 수행하였다. GFP 감

염 및 발현을 위하여, 10ms 동안 0.75kV/cm 내지 0.25kV/cm 사이의 다양한 펄스 조건 하에서 실험을 수행하였다. 도 8b는 현미경 위에 놓여진 전극 홀더 및 미세채널 장치를 도시한 것이다.

33> PI 흡수를 관찰하기 위하여, 100W 수은 램프 및 20×/0.4NA 대물렌즈를 구비한 역상 형광 현미경(LX790, Olympus, 미국)을 사용하였다. 여기 광을 530 ± 20 nm 밴드패스 필터로 광학적으로 필터링하고, 전기천공된 세포로부터 유도된 형광을 590nm 롱패스 필터로 필터링하였다. 12-비트 CCD 카메라(PCO, Kelheim, 독일)를 사용하여 15프레임/초로 해상도 640×480 화소의 이미지를 얻었다. 노출 시간은 모든 경우에 대하여 10ms이다.

34> 세포 생존능 및 GFP 감염에 대한 형광을 관찰하기 위하여, 여기광을 475 ± 15 nm 밴드패스 필터로 필터링하고, 유도된 형광을 520nm 롱패스 필터로 필터링하였다. 컬러 3IT CCD 카메라(AW-E300, Panasonic, 미국)를 사용하여 해상도 640×480 화소의 이미지를 얻었다.

35> 4. 실험 결과

36> AI 전극을 사용하는 큐벳(도 1 참조) 내에서 전기 펄스를 인가한 경우 전극 표면에 전기화학적으로 기포가 발생하여, 액체 및 기체의 2개 상의 층이 생성되었다. 도 9는 전기 펄스 인가 전후의 큐벳의 AI 전극 표면을 도시한 것이다. 좌측은 전기 펄스 인가 직전의 전극 표면이다. 우측은 전기 펄스 인가 직후에 전극 표

면 상에서 기포가 형성되는 것을 나타낸 것이다.

37> 상기 기포는 매우 빠른 속도로 생성되며, 복잡한 액체 운동을 일으킨다. 이러한 기포 운동은, 펄스 인가 중 전기영동과 결합하여, 벌크 배지 및 세포의 불균일한 상태를 야기한다. 또한, 알루미늄은 전해질에 의하여 산화층(Al_2O_3)을 쉽게 형성하는 물질이다. 상기 알루미늄 전극의 산화층이 높은 저항층으로서 작용한다.

38> 본 발명에 따른 미세채널 장치에서는 기포 형성이나 배지의 복잡한 운동이 발견되지 아니하였다. 이는 본 발명에서 사용한 전극 물질(Pt)의 화학적 안정성에 의하여 설명할 수 있다. 따라서, 기포가 생성되는 큐벳 내에서 벌크 배지의 운동은 매우 강하지만, 기포가 발생하지 않는 본 발명에 따른 미세채널 장치 내 배지는 안정한 조건을 유지할 수 있다. 또한, 본 발명의 미세채널 장치는 시각적 투과성이 우수하고, 전극 등에 의하여 시각적으로 방해받지 아니하므로, 전기천공 기전을 현미경 등의 장치를 이용하여 시각적으로 연구할 수 있다.

39> 5. 삽입률(intercalation rate) 및 전기투과성화 과정 검사

30> 본 발명에 따른 미세채널 장치에서 펄스 인가 후, 미세채널 내에 밀리-초(ms) 단위에서 PI의 국소적 유입이 관찰되었다. 통상의 시스템에서 동일한 범위의 전기장이 인가된 경우, 미세 채널 내의 거의 모든 세포에서 PI의 투과성화가 검지되었다. 도 10은 $100\mu\text{m}$ 폭 미세채널 내에서 PI 유입 과정을 도시한 것이다.

31> 펄스 인가 직후, PI가 양극(anode) 방향에서만 유입되었다. 이러한 현상은

좌측의 세포막이 변화되었음을 의미한다. 시간이 경과함에 따라, 형광이 전체 세포 내부(c 내지 d)로 확산되고, 10초 후에는 핵산이 형광(e 내지 h)을 방사하기 시작하였다.

32> 이러한 관찰은 핵산에 결합하는 PI 특성을 직접적으로 반영한다. 단일 생존 세포에서 실시간으로 관찰할 수 있는 기능은 매우 유리하다. 기본적인 세포 과정에서 중요한 정보를 제공할 수 있기 때문이다.

33> 예를 들어, 형광 공명 에너지 전달(FRET, fluorescence resonance energy transfer)을 검출함으로써, 세포질 내에서 올리고 DNA 쌍이 c-fos mRNA와 혼성되는 것을 관찰할 수 있다. 또한, 실시간으로 직접적인 관찰이 가능하므로, 본 발명에 따른 미세채널 장치는 매우 유용하다.

34> 6. 미세채널 장치에서의 채널 폭 변화에 따른 효과

35> 미세채널 장치에서, 염료 흡수에 의한 형광의 세기는 채널 폭에 따라 다양한 것으로 관찰되었다. 동일한 전기 펄스가 인가되는 경우에도, 채널 폭이 증가할수록 세포 영역에 대한 그레이 스케일 단위의 세기가 감소되었다. 도 11은 각각 100 μm (a) 및 500 μm (b)의 상이한 채널 폭을 갖는 두 개의 채널에 대한 펄스 인가후 30 초에 촬영한 세포의 현미경 사진이다. 전기장은 1kV/cm이고, 펄스 지속시간은 10ms이다. 채널 폭이 좁은 미세채널(100 μm)에서의 PI 흡수가, 채널 폭이 넓은 미세채널(500 μm)에서의 흡수보다 더 크다는 것을 알 수 있다.

- 36> 채널폭이 상이한 5개의 미세채널에 대한 PI 흡수를 비교하기 위하여, 실험을 수행하면서 15프레임/초로 영상을 촬영하였다. 50프레임마다 영상 처리를 수행하였다. 그래픽 소프트웨어(Paint Shop Pro 7.0, Jasc Software, 미국) 및 MATLAB 프로그램(MathWorks, Inc., 미국)을 사용하여, 세포 영역에 대한 그레이 스케일 유닛으로부터 배경에 대한 그레이 스케일 유닛의 평균 세기를 감산하였다. PI 세기에 대한 비교 데이터를 도 12에 도시하였다.
- 37> PI 흡수에 대하여 채널 폭이 영향을 미침을 알 수 있다. 큐벳 기반의 시스템에서 전극 간극을 제외한 기하학적 파라미터는 심각하게 고려되지 아니하였기 때문에, 미세채널에서의 이러한 현상은 주목할 만하다.
- 38> 세포에 대한 전기 펄스의 효과는 명시야(bright field) 상으로 분석할 수 있다. 명시야 분석법을 $150\mu\text{m}$ 및 $500\mu\text{m}$ 폭의 두 가지 조건 하에서 수행하였다. 펄스 조건은 다른 실험과 동일하였다(10ms 간 1kV/cm 전기장). 전기 펄스에 노출시킨 후의 영상을 펄스 인가 후 25초에 얻었다. 전기 펄스에 노출되는 경우, 세포가 즉시 팽윤되었다. 도 13은 $150\mu\text{m}$ (a) 및 $500\mu\text{m}$ (b)의 두 가지 경우에 대한 이미지 분석 결과를 도시한 것이다.
- 39> 오토캐드(AutoCAD) 2002(Autodesk, Inc., 미국)를 사용하여 세포 직경 증가를 측정하고, 펄스 인가 전의 직경에 대한 증가율을 계산하였다. $150\mu\text{m}$ 채널 폭에서의 세포 직경은 약 23% 증가하였으나, $500\mu\text{m}$ 채널폭에서의 세포 직경은 약 10% 증가하였다. 채널 폭에 따른 이러한 차이점은 전기천공의 정도가 상이하기 때문인 것으로 보인다. 이러한 결과로부터, 미세채널에서의 전기천공시, 채널 폭 또는 높

이와 같은 채널 단면의 기하학적 형상을 고려하여야 함을 알 수 있다.

10> 7. PDMS 미세채널 장치에서의 세포 배양

11> PDMS는 그의 생체적합성 및 투과성으로 인하여 미세채널 장치의 세포 배양 시스템에 적합한 물질이다. EGFP 감염 실험시 전기천공 후 세포내에 발현시키기 위해서는 통상 24시간 이상 소요되기 때문에, 본 발명에 따른 미세채널 장치에서 EGFP 감염 실험시 세포 배양 기능이 필요하다.

12> 미세채널이 세포 배양기로서 사용 가능한지를 검사하기 위하여, 미세채널 내에 세포를 주입하고, 전체 PDMS 미세채널 장치를 세포 배지(DMEM)에 침지시켰다. 이를 인큐베이터에서 7일간 보관하였다. 도 14는 배양 결과를 도시한 것이다.

13> PDMS 미세채널 장치에는 PDMS와 유리를 결합시키기 위한 O_2 플라스마 처리만을 수행하였다. 7일 후, 웰 및 미세채널 말단의 세포를 관찰한 결과, 바닥면의 웰 상에 잘 분산되어 우수한 상태에 있음을 알 수 있었다. $50\mu m$ 채널 폭의 미세채널 중앙의 세포는 여전히 생존하였으나, 상태는 그리 우수하지 않았다(도 14a). 이는, 채널 길이에 비하여 채널 폭이 작아 협소한 물리적 공간과 산소 및 CO_2 등의 부족이 세포 배양에 악영향을 미친 것으로 보인다.

14> 도 14에서 (b), (c) 및 (d)는 각각 채널폭이 $150\mu m$, $200\mu m$ 및 $250\mu m$ 인 경우에 대한 실험 결과를 도시한 것이다. 더 넓은 미세채널에서, 세포가 부착되고, 확산되고, 성공적으로 이동됨을 알 수 있다.

15> 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 미세장치에서 세포 배양이 가능함을 알 수 있다. 이는, 장기간에 걸친 다양한 세포에 대한 연구에 있어서, 실시간 시각화 기능과 함께 많은 장점을 제공한다. 또한, 나노미터 크기의 반도체인 퀀텀 도트 (quantum dot)를 사용하여, 장기간에 걸쳐 생존 세포내 다수의 단백질의 경로를 동시에 추적하는데, 본 발명에 따른 미세채널 장치가 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

16> 8. SK-OV-3 세포에서의 EGFP 발현

17> 유전자 발현의 마커로서 널리 사용되는 EGFP로 실험을 수행하였다.

18> 먼저, 1.5kV 전기 펄스를 인가하여, 0.75kV/cm의 전기장을 10ms간 유발시켰다. 이는, 시판중인 BTX 전기천공 장치를 사용하여 SK-OV-3 세포를 감염시키기에 적합한 조건이다. 이러한 전기장 조건은, 미세채널 내의 세포에 대해서는 지나치게 가혹한 조건이다. 24시간 후에 세포를 검사하고, 그 결과를 도 15a에 도시하였다. 세포가 바닥면에 확산될 정도로 우수한 상태가 아님을 알 수 있다. 형광은 검출되지 아니하였다.

19> 시판중인 전기천공 장치에 적합한 전기장은 본 발명에 따른 미세채널 장치에 지나치게 강하기 때문에, 본 실험에서 전기장을 0.25kV/cm 내지 0.75kV/cm의 범위 내에서 변화시켰다. 그 결과, 0.4kV/cm 내지 0.5kV/cm 범위 하에서 세포가 성공적으로 감염되고, 녹색 형광을 방사함을 발견하였다. 가장 바람직한 조건은

0.4kV/cm이다. 도 15에서 (b) 및 (c)는 그 결과를 도시한 것이다. 이러한 결과로부터, 미세채널 내에서의 전기천공 효과는 큐벳을 사용하는 경우보다 훨씬 우수함을 알 수 있다.

10> 본 발명에 따른 미세장치는, 실시간으로 주입 과정을 시각화할 수 있다. 기포 생성 및 세포 배치와 세포의 복잡한 운동도 관찰되지 아니하였다. 큐벳과 달리 미세채널은 길고 좁은 채널의 기하학적 구조에 의하여 전류가 흐르는 방향이 한정되므로, 전체 미세채널에 걸쳐 균일한 전기장이 형성된다. 이러한 미세채널 내의 균질한 내부 환경은 세포내 PI 흡수율을 상승시킨다. 다양한 채널 폭에 대하여 기하학적 효과를 확인하였다. 이러한 결과는 채널의 기하학적 형태가 또하나의 파라미터가 될 수 있음을 의미한다.

11> 상기 실험 결과로부터, 본 발명에 따른 미세채널 장치가 유전자 조작시 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

【발명의 효과】

12> 본 발명에 따른 미세채널 장치는, 채널경로 길이를 다양하게 변화시킴으로써 다양한 크기의 전기장 구배를 형성할 수 있다. 채널 폭도 다양하게 변화시킬 수 있다. 미세채널 장치의 설계를 변경함으로써 다양하게 적용시킬 수 있다. 큐벳을 이용한 종래의 장치에 비하여 더 낮은 전기장을 인가하여 동일한 결과를 얻을 수 있다. 또한, 전기장의 세기 조절이 용이하며, 웰의 개수도 적절히 조정할 수 있다.

- 13> 또한, 복수의 샘플을 동시에 분석할 수 있다. 전기천공 과정을 현미경으로 검경하면서, 실시간으로 시각적으로 분석할 수 있다. 각각의 세포를 조사할 수 있다. 따라서, 하나의 세포를 분석하는 단일 세포 분석에 적합하다.
- 14> 내부에 전극이 장착되어 있지 아니하고, 플라스틱 재료를 사용하므로, 저렴한 비용으로 제조할 수 있다. 즉, 1회용 큐벳 내에 전극을 장착하는 것이 아니라, 별도의 전극을 영구적으로 사용하므로, 전극 재료로서 우수한 고가의 백금 또는 금 전극을 사용할 수 있다. 이들 전극은 전기화학적으로 안정하기 때문에, AI 전극 사용에 따른 부작용이 없다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공용 미세채널 장치로서,

상기 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 1쌍의 웰이 양측에 형성되어 있고,

상기 1쌍의 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 하나 이상 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 채널은 1개 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 채널은 복수개 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 각 채널의 채널경로길이는 서로 상이한 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 5】

제 2 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 채널의 채널경로길이는 1mm 내지 10cm

인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 6】

제 3 항에 있어서, 상기 각 채널의 폭이 서로 상이한 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 채널의 폭은 $10\mu\text{m}$ 내지 10mm 인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 8】

제 3 항에 있어서, 상기 채널의 높이는 $2\mu\text{m}$ 내지 2mm 인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 9】

세포를 포함하는 시료에 전기장을 인가함으로써 세포막을 전기적으로 천공하여 세포 내에 물질을 주입하기 위한 전기천공용 미세채널 장치로서,

상기 시료에 전기 펄스를 인가할 수 있도록 펄스 생성기의 전극을 삽입하기 위한 복수개의 쌍의 웰이 양측에 형성되어 있고,

상기 웰 중 서로 대응하는 웰을 연결하며, 상기 시료를 충전하기 위한 공간을 형성하는 채널이 복수개 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 상기 웰은 상기 각 쌍의 웰 사이의 최단 거리가 서로 상

이하도록 배치되는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 11】

제 9 항에 있어서, 상기 복수개의 쌍으로 형성되어 있는 웰을 연결하는 채널은 각각의 쌍의 웰에 대하여 하나씩 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 각 채널의 폭이 서로 상이한 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 13】

제 9 항에 있어서, 상기 복수개의 쌍으로 형성되어 있는 웰을 연결하는 채널은 각각의 쌍의 웰에 대하여 복수개 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 14】

제 11 항 또는 제 13 항에 있어서, 상기 각 채널의 채널경로길이는 서로 상이한 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서, 상기 채널의 채널경로길이는 1mm 내지 10cm인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 16】

제 11 항 또는 제 13 항에 있어서, 상기 각 채널의 폭이 서로 상이한 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 17】

제 16 항에 있어서, 상기 채널의 폭은 $10\mu\text{m}$ 내지 10mm 인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 18】

제 11 항 또는 제 13 항에 있어서, 상기 채널의 높이는 $2\mu\text{m}$ 내지 2mm 인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 19】

제 1 항 또는 제 9 항에 있어서,

상기 미세채널 장치는 상부 기판 및 하부기판을 포함하되,

상부기판에는 상기 웰을 형성하는 홀이 형성되어 있고,

상부기판 또는 하부기판에는 상기 채널이 음각되어 있는 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 상기 상부기판의 재질은 폴리디메틸실록산, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리카보네이트, 사이클로올레핀코폴리머, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리아미드, 사이클로올레핀폴리머, 실리콘(silicon), 유리, 또는 석영인 것을 특

징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 21】

제 19 항에 있어서, 상기 하부기판의 재질은 폴리디메틸실록산, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리카보네이트, 사이클로올레핀코폴리머, 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리아미드, 사이클로올레핀폴리머, 실리콘(silicon), 유리, 또는 석영인 것을 특징으로 하는 미세채널 장치.

【청구항 22】

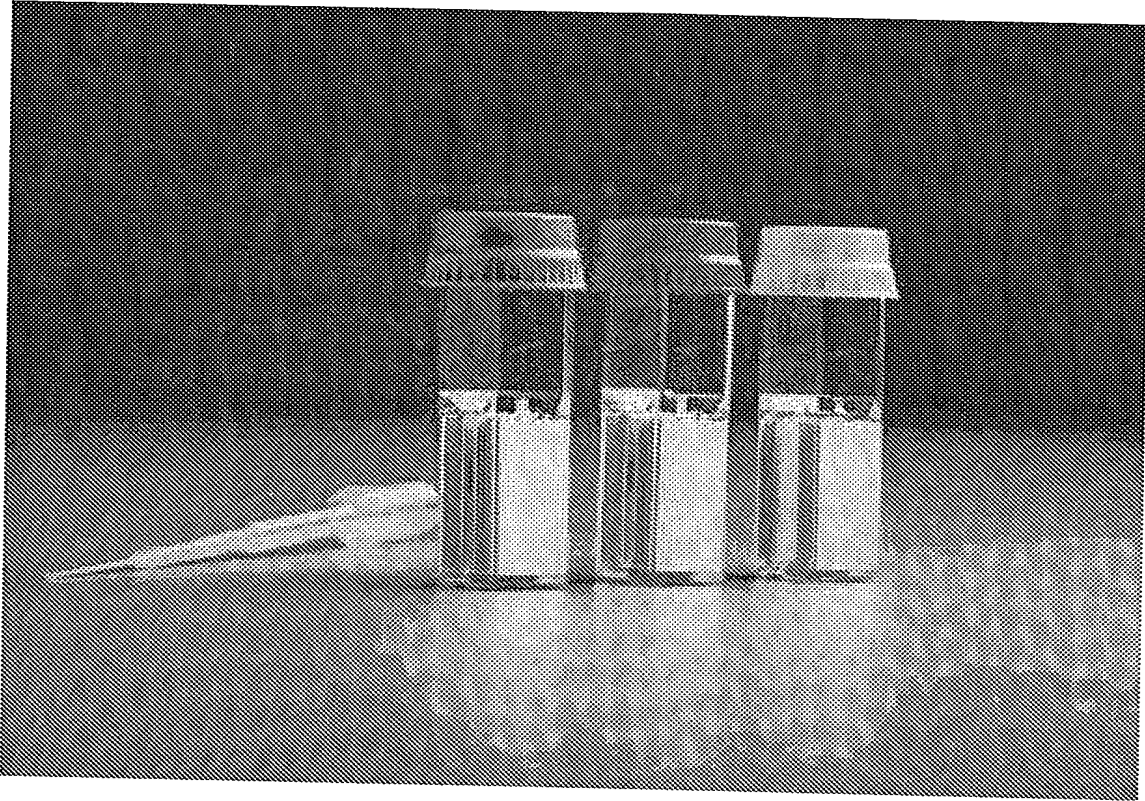
제 1 항 또는 제 9 항에 따른 미세채널 장치 및 소정 시간 간격의 전기 펄스를 발생시키는 펄스 생성기를 포함하되, 상기 펄스 생성기에는 시료에 상기 전기 펄스를 인가할 수 있는 전극이 구비되어 있는 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

【청구항 23】

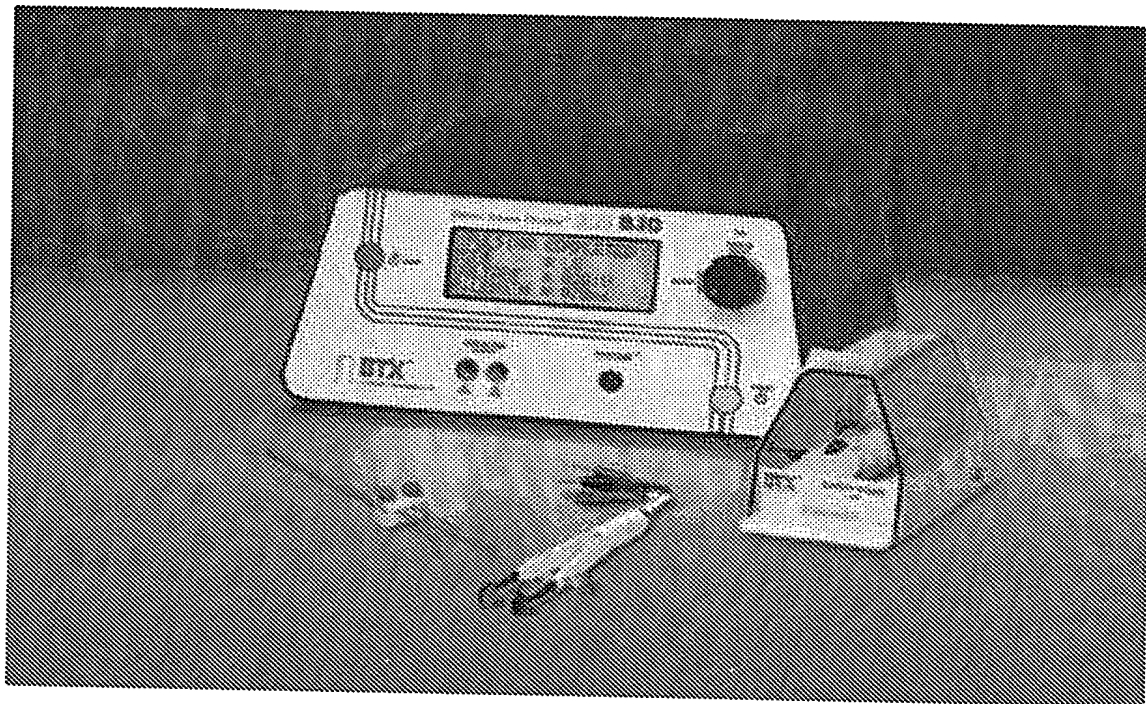
제 22 항에 있어서, 상기 전극은 백금전극 또는 금전극인 것을 특징으로 하는 전기천공 장치.

【도면】

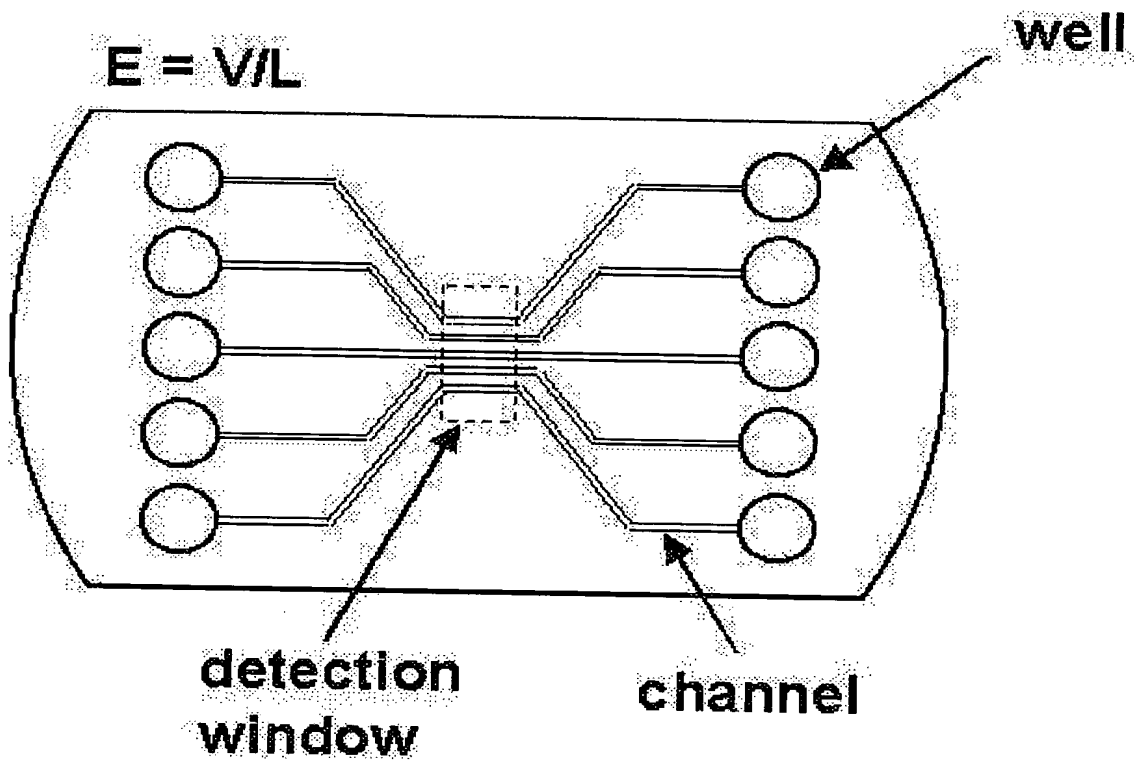
【도 1】



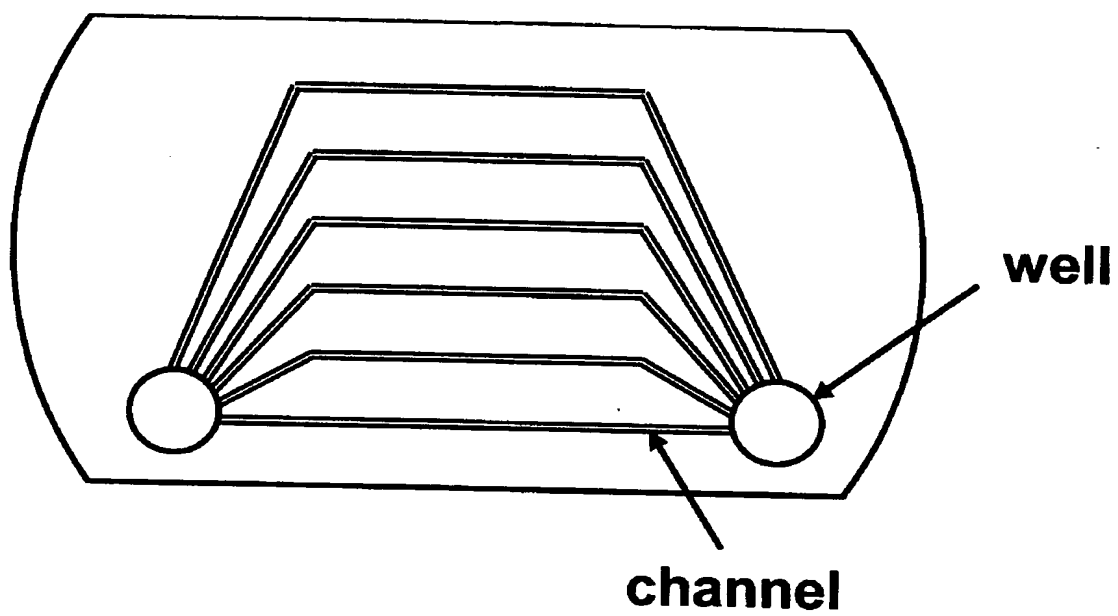
【도 2】



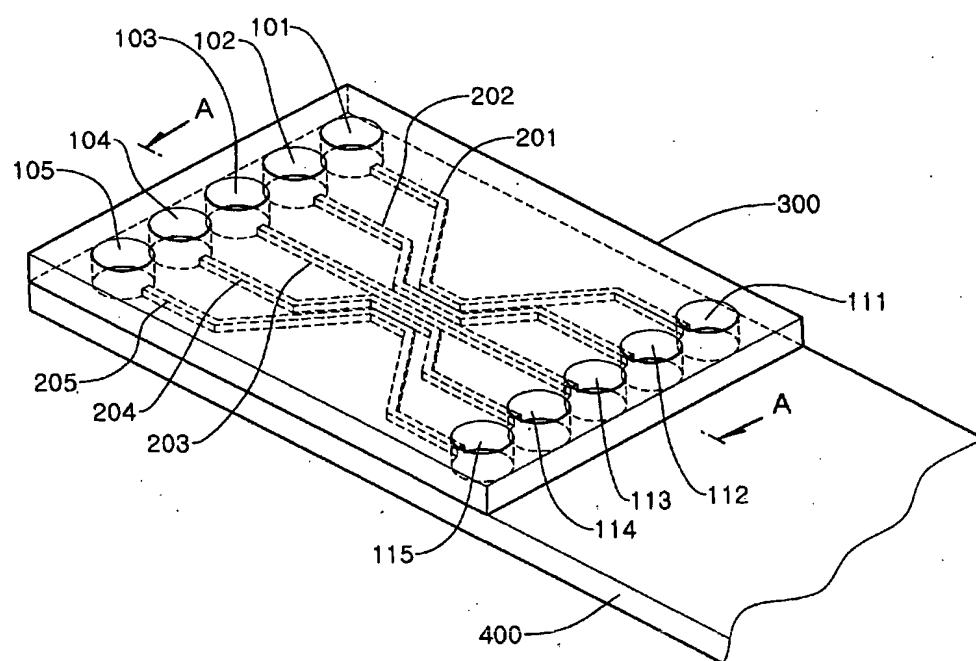
【도 3a】



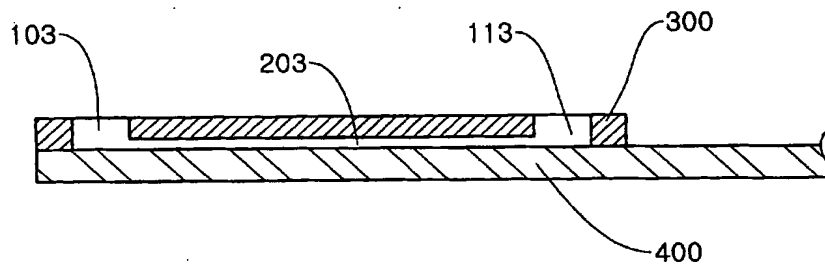
【도 3b】



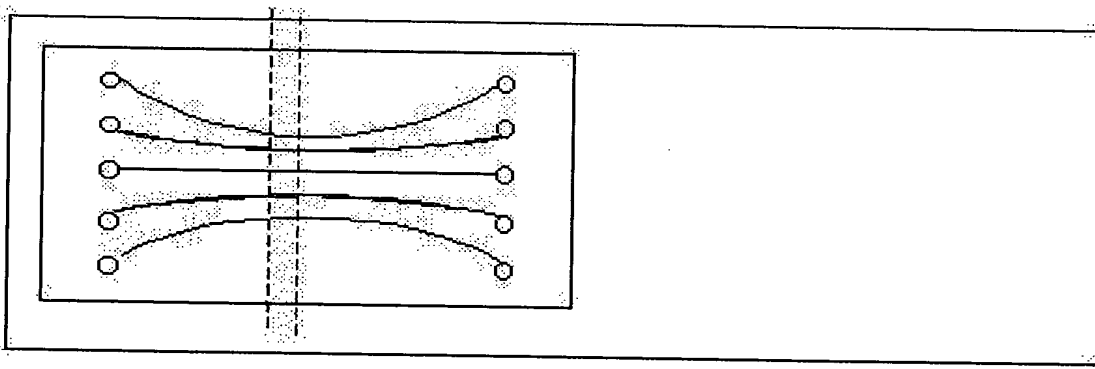
【도 4a】



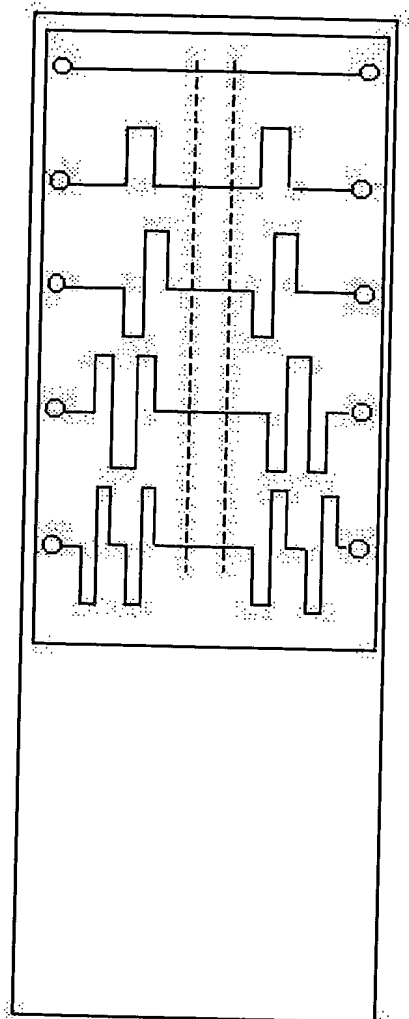
【도 4b】



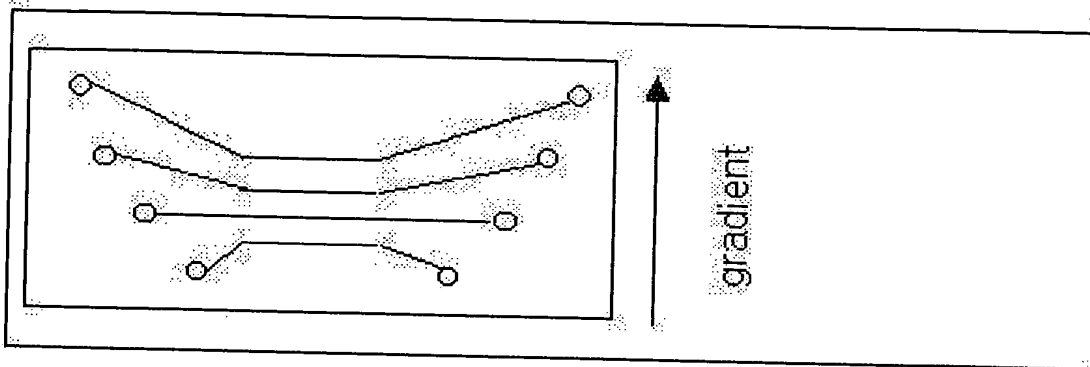
【도 5a】



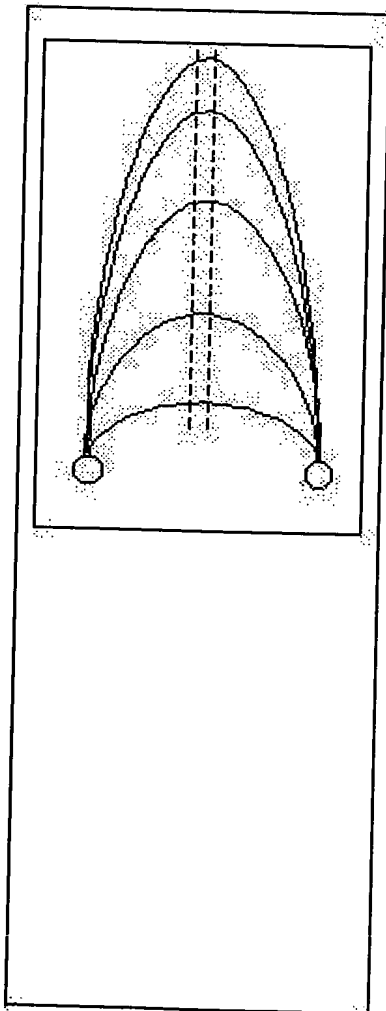
【도 5b】



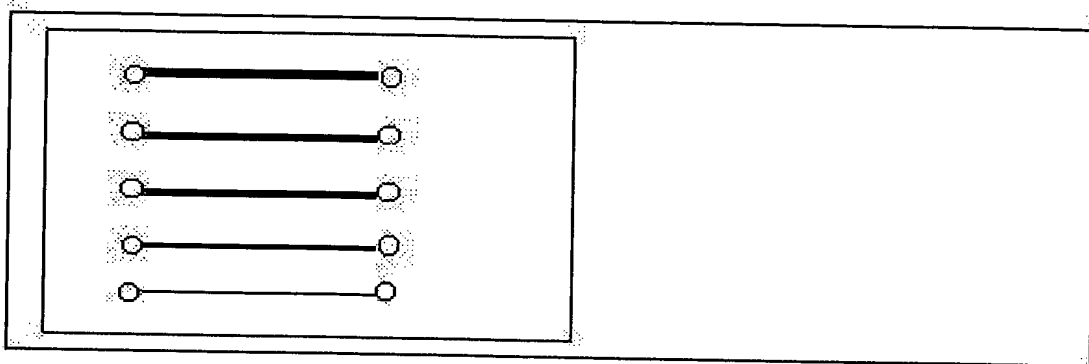
【도 5c】



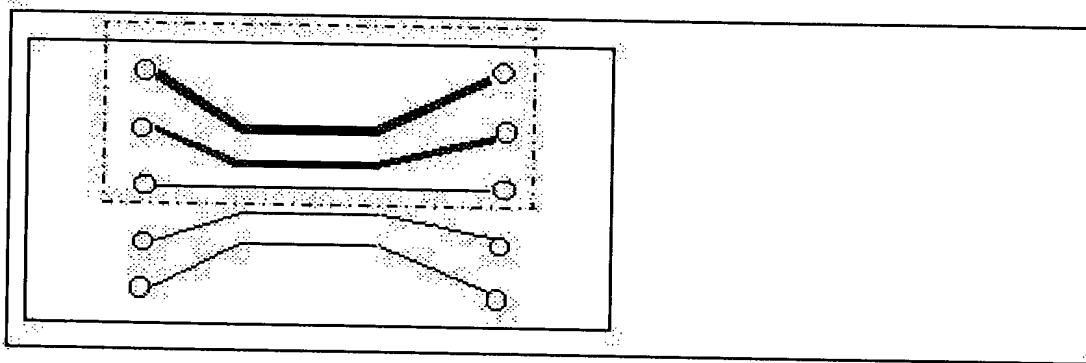
【도 5d】



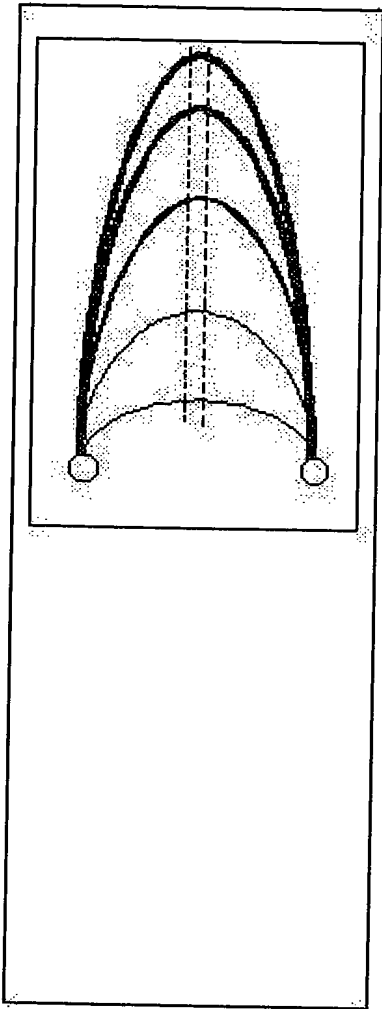
【도 6】



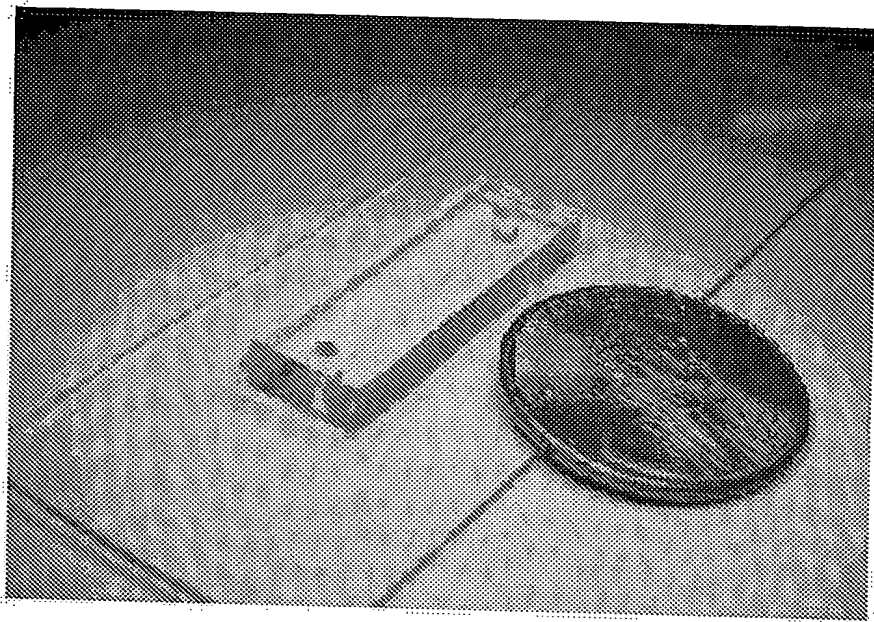
【도 7a】



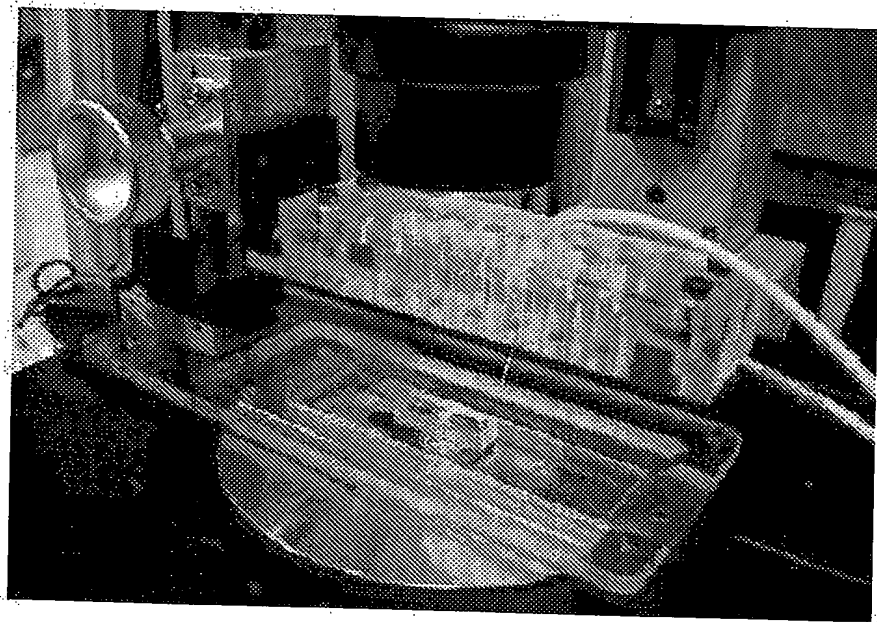
【도 7b】



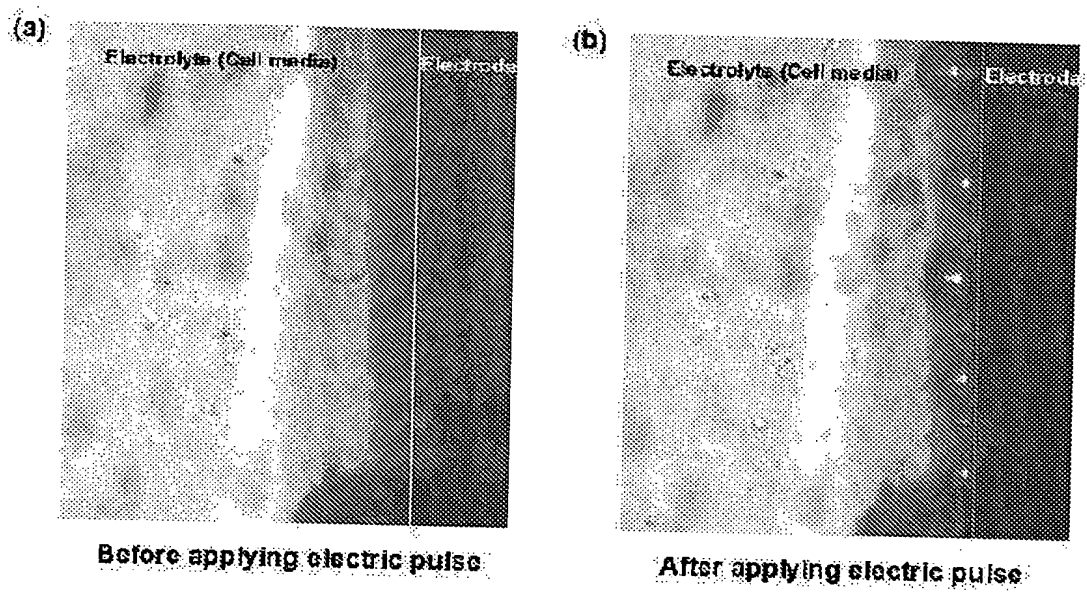
【도 8a】



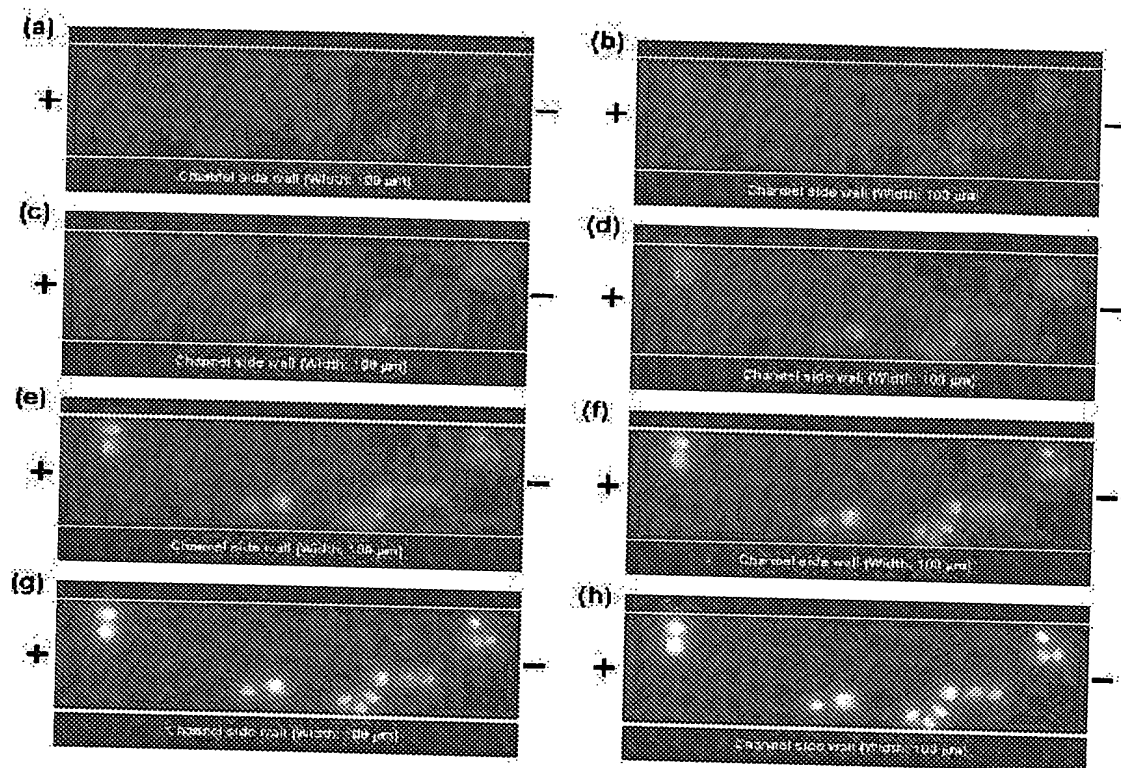
【도 8b】



【도 9】

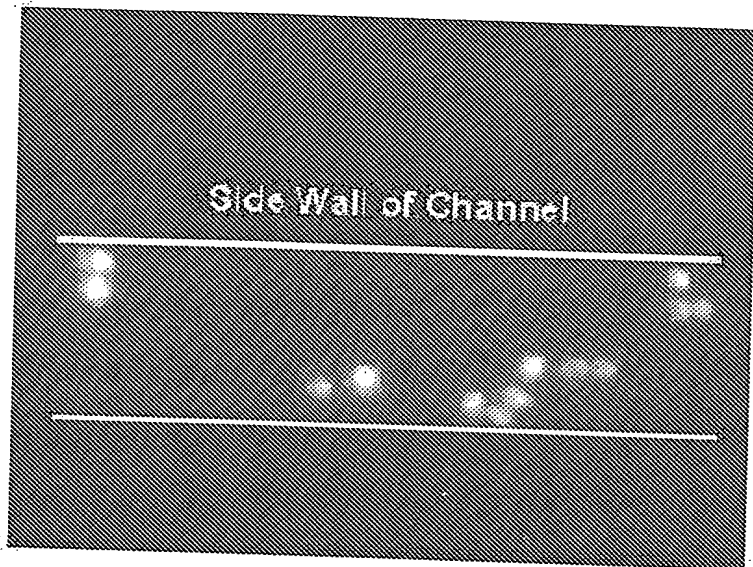


【図 10】

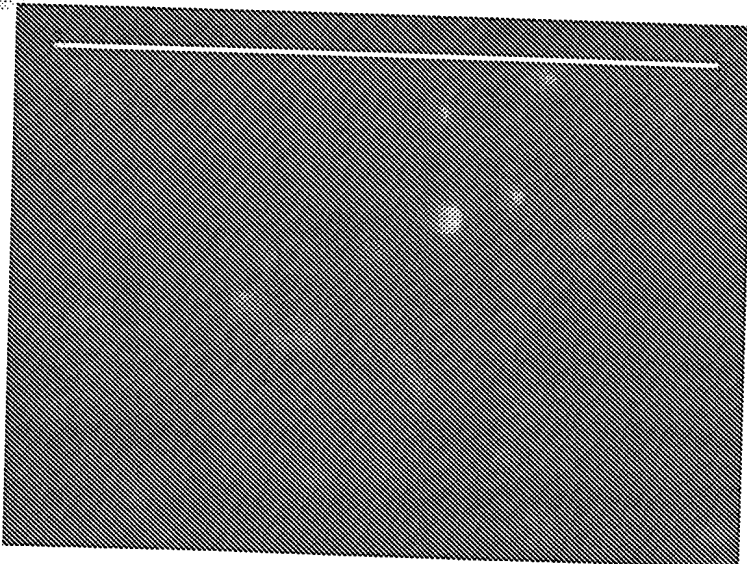


【図 11】

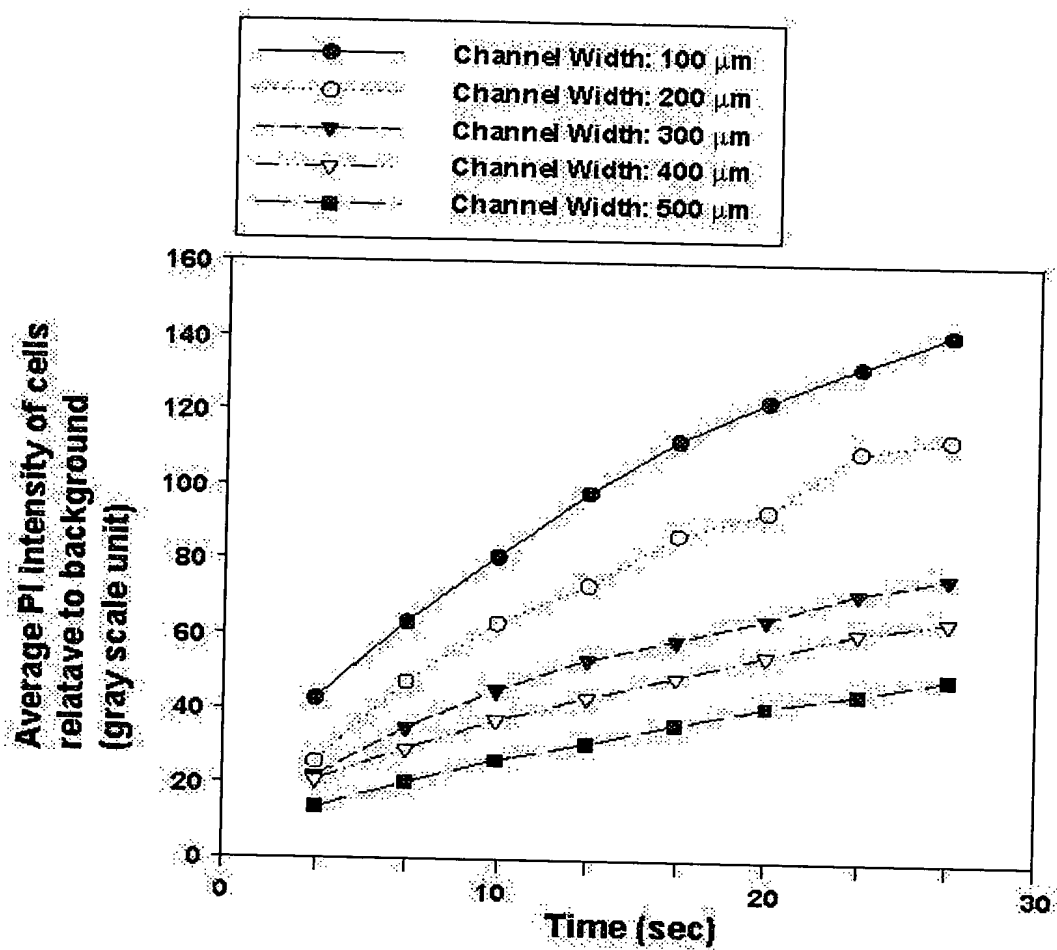
(a)



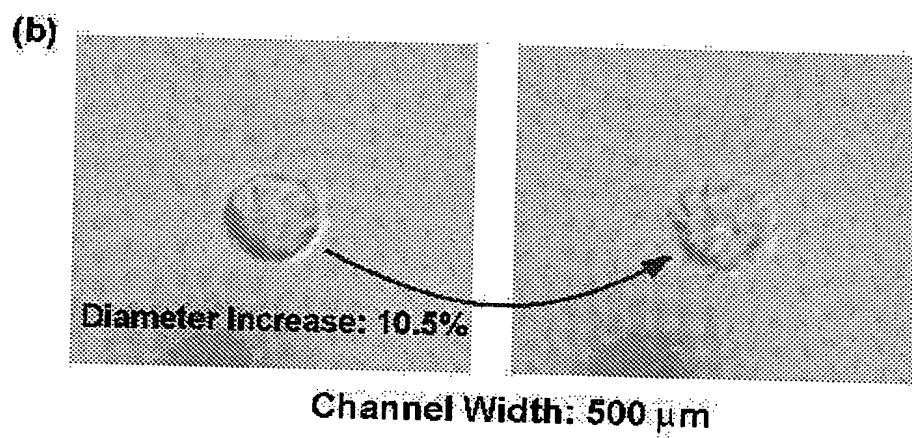
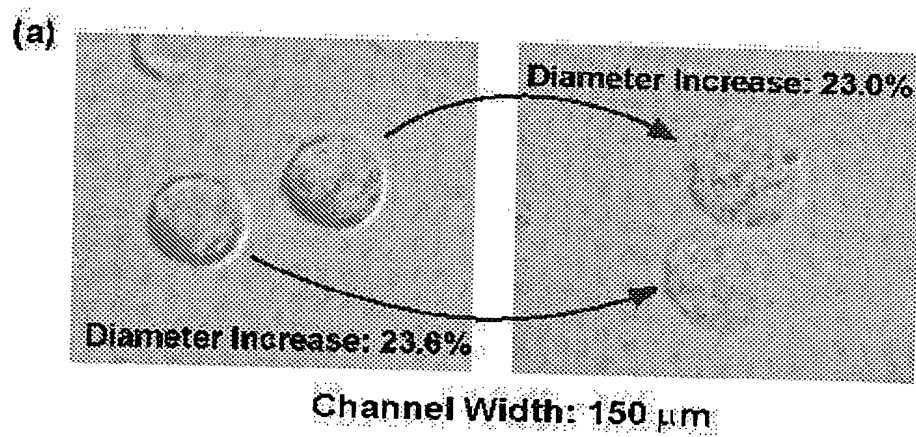
(b)



【도 12】

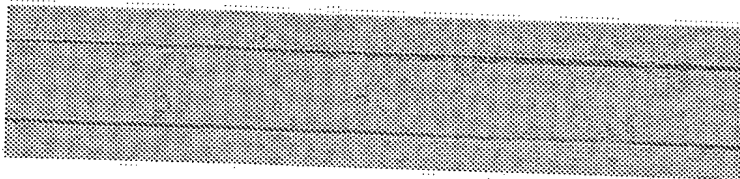


【図 13】

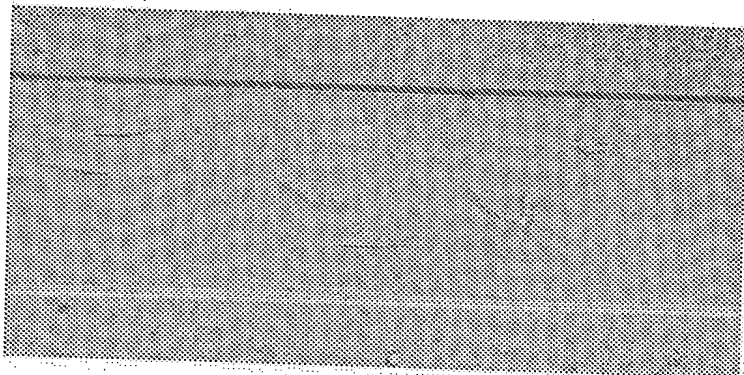


【図 14】

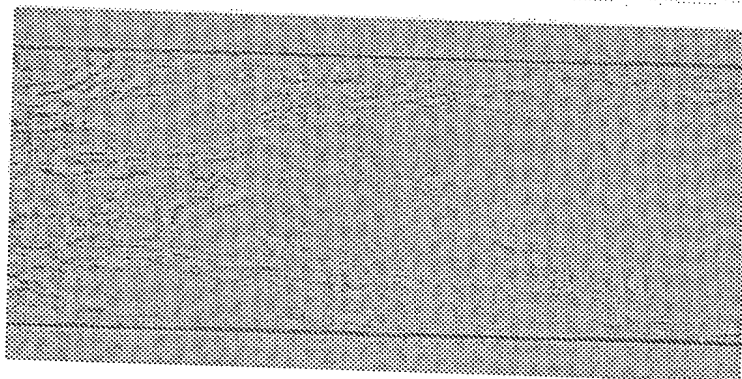
(a)



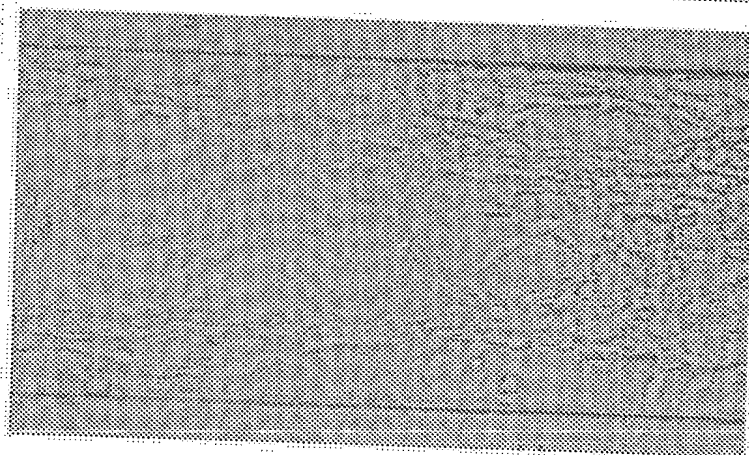
(b)



(c)

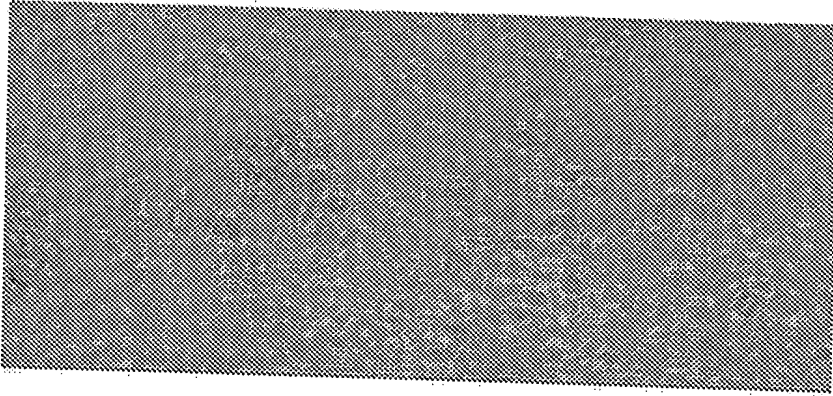


(d)

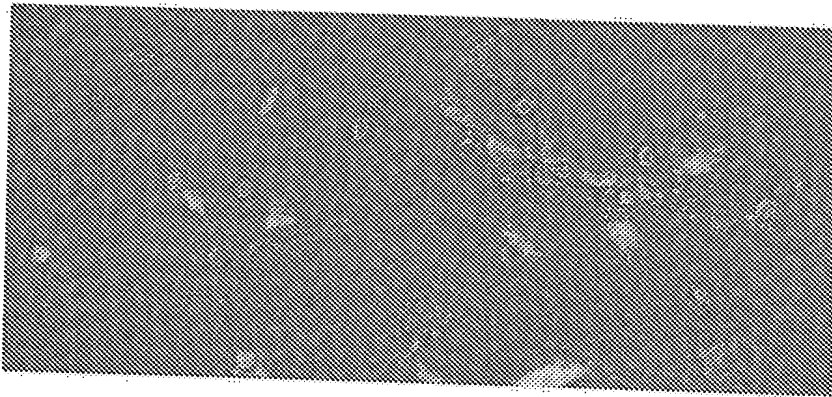


【도 15】

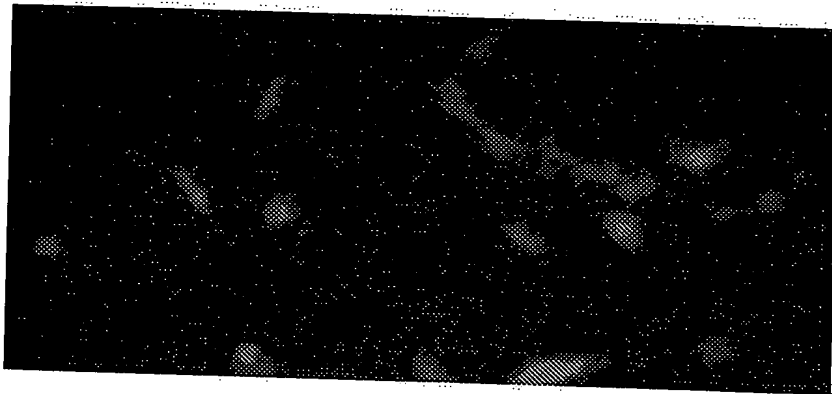
(a)



(b)



(c)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.